تحديد المجامع المتكاملة خضريا عند عشيرة فطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* عزلت في منطقة بني عباس بالجهة الغربية من الجزائر

*جمال الدين هـــــني، مبروك كيحل، احمد بن سلطان

Abstract

The vegetative complementary has been studied from the *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* obtained from plants of palm trees infected by the Fusarium wilt (*Foa*) and the close soil rizosphere (*Fo*). After testing all the crossing possibilities undertaken between the complementary mutants for the mineral nitrogen assimilation, one vegetative complementary group (nitM, nit1 and nit3) has been identified. This (VCG) gathered all the formae specials *albedinis* (*Foa* 1; 2 ; 4 ; 7 ; 12). The isolates that are not belonging to the formae specials *albedinis* (*Fo* 3; 5 ; 6 ; 8 ; 10 ; 11) appeared auto-incompatibles between them and inter-incompatibles with all other isolates.

Key-Words : *Fusarium oxysporum* - *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* – *Phoenix dactylifera* – Vegetative compatibility.

ملخص

درس التكامل الخضري عند عزلات عشيرة فطر *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (*Foa*) الـــتي تم الحصول عليها من نباتات النخيل المصابة بالذبول الفيوزاري (*Foa*) ومن التربة المجاورة لها(*Fo*). تمت الدراســـة عـــن طريق الاندماج الخلوي لكل العزلات الطافرة للأنزيم المرجع للنترات (nitM, nit1 and nit3). تم تحديد مجموعة متكاملة خضريا (VCG) تضم عزلات متجانسة ممرضة تنتمي كلها إلى *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (*Foa* 1 ; 2 ; 4 ; 7 ; 12) ، أما العزلات الباقية التي تضم الأفراد المترممة من نوع (*Fusarium oxysporum*) (*Fo* 3 ; 5 ; 6 ; 8 ; 10 ; 11) فهي غير متكاملة ذاتيا و غير متكاملة مع الأفراد الأخرى.

مفاتيح الكلمات : *Fusarium oxysporum* - *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* – *Phoenix dactylifera* – التكامل الخضري.

*مخبر أمراض النبات، معهد علوم الطبيعة، جامعة وهران، الجزائر.

I- المقدمة

الفطريات الضارة بالمحاصيل الزراعية عديدة ومتنوعة، ومن أخطرها مرض الذبول الفيوزاري (Fusarium wilt) عند أشجار النخيل. يتسبب هذا المرض عن الفطر *Fusarium oxysporum* (*Foa*) f. sp. *albedinis*، الذي يدخل الأوعية الناقلة للنخلة عن طريق جروح الجذور، فينمو داخلها مسببا انسدادها، فذبولها ثم موتها (Messiaen and Cassini, 1968) [1] (Bounaga, 1985) [2]. هذا الفطر بعد أن قضى على كل انواع أشجار النخيل المغربية الحساسة له (خاصة *دكلة نور*) ، إنتشر في الجزائر (Djerbi, 1990)[3]، و حسب (Brac De La Perière and Benkhalifa, 1991)[4] فإن أغلبية اشجار النخيل الحساسة الموجودة بغرب الجزائر مصابة بهذا المرض.

عند الفطريات الناقصة مثل فطر *Fusarium oxysporum* (*Fo*) لا يوجد إلقاح جنسي، فتبادل المواد الوراثية بين فردين لا يحدث إلا عن طريق الاندماج الخلوي (Heterokaryosis)، وهو نوع من اللقاح الجنسي المتوازي (Para-sexuality). فعند حدوث الاندماج الخلوي بين خيوط الغزل الفطري (الميسيليوم) لفردين يتكون خلاله خلية متباينة وراثيا (Heterokaryon)، مما يسمح لكل منهما أن يعوض ما به من نقص في المواد الوراثية. لكن حسب (Correll *et al.*, 1987) [5] ، فإن الاندماج الخلوي تعترضه عراقيل عند الفطريات الناقصة، لأن ظاهرة التكامل الخضري عندها، تتحكم فيها اليلات *Loci* التكامل، و التي تعرف على حسب الأنواع بـ *vic* gene و *het* gene . ففردين متكاملين خضريا أي لهما نفس اليلات التكامل، فإن هيفاتها الميسلية لها القدرة على الاندماج الخلوي وتكوين خلية متباينة، وبالعكس في حالة فردين غير متكاملين خضريا، فإن هيفاتهما غير قادرة على الاندماج الخلوي ، وإن حصل اندماج فان الخلية المتباينة الناتجة تضمحل بسرعة. هذه الملاحظات سمحت إلى (Puhalla, 1979) [6] بتعريف المجموعات المتكاملة خضريا (VCG) (Vegetative Complementary Group) عند فطر (*Verticillium albo-atrum*) و استنتاج أن خاصية التكامل الخضري لها أهمية كبيرة عند دراسة بيولوجية العشائر الفطرية لأنها تسمح بتمييز طفيل حديث (New pathotype) و تتبع انتشار وبائه (Epidemiology). فمثلا (Correll *et al.*, 1988) [7] وجدوا أن عدة عزلات لفطر(*Verticillium albo-atrum*)، ذات أصل جغرافي مختلف (من أمريكا و أوروبا) تنتمي لنفس (VCG)، واستنتجوا على أن هذه العزلات في الواقع من أصل واحد. فالتكامل الخضري إذن له أهمية كبيرة عند القيام بأي دراسة بيولوجية للعشائر الفطرية، فالأفراد التي تنتمي إلى نفس (VCG) احتمال تطورها جغرافيا جنبا إلى جنب كبير، عكس تلك الأفراد التي لا تنتمي إلي نفس (VCG)، فإنها تتطور بصفة منعزلة عن بعضها البعض حتى و لو كانت قريبة جغرافيا(Correll *et al.*, 1988) [7].

تهدف هذه الدراسة لمعرفة وتحديد التجانس والتباين الوراثي لصفة التكامل الخضري عند العشائر الفطرية لـ *Fusarium oxysporum* f. sp *albedinis*.

II- المواد و طرق العمل

ا- مصدر العشائر الفطرية

عشيرة فطر (*Fo* f.sp. *albedinis*) تم عزلها من أشجار النخيل المصابة بالذبول الفيوزاري من منطقة بني عباس (سنة 1997/1996)، أما عشيرة فطر (*Fusarium oxysporum*) تم الحصول عليها من التربة المحيطة لهذه النباتات.

ب- الحصول على المزارع النقية وحيدة البوغة

للحصول على المزارع النقية وحيدة البوغة "النسخ" (Clones)، و تعريف المظهر المورفولوجي للعشائر، تمت حسب طريقة (Henni *et al.*, 1994) [8].

ج- البيئات المستعملة (Puhalla, 1985) [9] و (Correll *et al.*, 1986) [10]

البيئة الأساسية MB

- سكروز	30 غرام
- KH_2PO_4	1 غرام
- KCl	0,5 غرام
- $MgSO_4$	0,5 غرام
- $FeSO_4$	0,5 غرام
- *محلول العناصر الصغرى*	2 ملل
- *حمض السيتريك*	5 غرام
- $Zn\,SO_4,\ 7H_2O$	5 غرام
- $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2\ ,\ 6H_2O$	1 غرام
- $Cu\,SO_4,\ 5H_2O$	0,25 غرام
- $Fe\,SO_4,\ 7H_2O$	4,75 غرام
- $MnSO_4,\ H_2O$	50 ملغ

- $Na_2MoNO_4, 2H_2O$	50 ملغ
- H_3BO_3	50 ملغ
- H_2O	1000 ملل

بيئة النترات MM

- بيئة *MB*	1 لتر
- NO_3Na	2 غرام
- pH	5.7

بيئة كلورات

- بيئة *MM*	1 لتر
- $KClO_3$	15 غرام
- L-Asparagine	1,6 غرام
- pH	5.7

بيئة النتريت

- بيئة *MB*	1 لتر
- NO_2 Na	0,5 غرام
- pH	5.7

بيئة هيبوكسانتين (Hypoxanthine)

- بيئة *MB*	1 لتر
- Hypoxanthine	,2٠ غرام
- pH	5.7

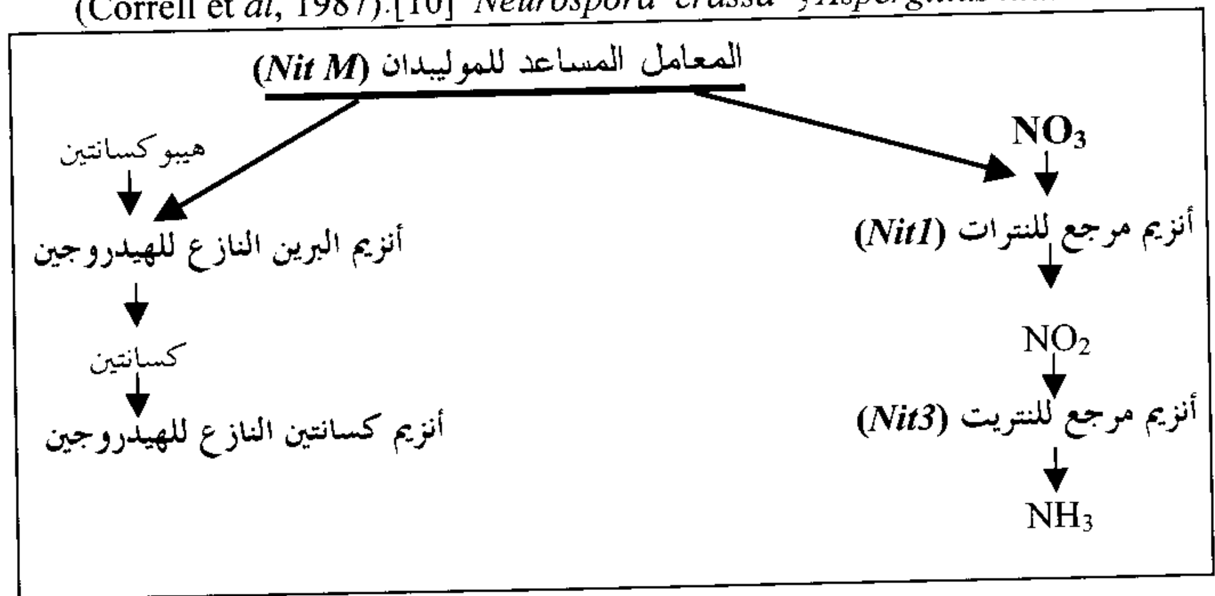
د- انتقاء النسخ المقاوم للكلورات (Chlorate resistant mutant)

عند نقل قطعة قطرها 0,5 سم من الميسليوم الطرفي لمزرعة نسخ، ثم نضعها في طبق بتري به بيئة الكلورات، نشاهد عند بعض القطع، بعد التحضين على 28°م لمدة أسبوع، نمو ميسيلي ضعيف (قطره أقل من 1سم)، يطلق عليه منطقة الكلورات (Chlorate zone). حسب (Puhalla, 1985) [9]، ضعف النمو راجع إلى تحويل الكلورات إلي الكلوريت السام بواسطة تحفيز الأنزيم المرجع للنترات. لذا فالفطر لا يمكنه النمو على بيئة تحتوي الكلورات، إلا إذا حدثت به طفرة في بنية الأنزيم المرجع للنترات (جدول 1). الهيفات الميسلية التي نمت حدثت

بها إذن طفرة في بنية الأنزيم المرجع للنترات، و تعرف بالنسخ الفطري الطـــافر المقـــاوم للكلـــورات (Chlorate resistant mutant).

للحصول على (Chlorate resistant mutant)، زرع من كل نسخ فطري، ٥ قطع ميسيلية موزعة في طبـــق بتري به بيئة كلورات.

جدول (1) : البنية التكوينية للمورثة المسؤولة عن الأنزيم المرجع للنترات عند *Aspergillus nidulans* و *Neurospora crassa* (Correll et *al*, 1987).[10]



- **nit 1**: أنزيم مكون المرجع للنترات (Nitrate reductase).
- **nit 3** : أنزيم مكون المرجع للنتريت (Nitrite reductase).
- **nit M**: مركب إنزيمي مسؤولة على تنظيم المعامل المساعد للموليبـــدان (Molybdene co-factors) الذي يعبر عن (nit7, nit6, nit5, nit4, nit2).

هـ- انتقاء النسخ غير المرجع للنترات (Clone mutant *nit*)

بعد الحصول على الميسليوم المقاوم للكلورات، لا بد من التأكد من استقرار الطفرة غير مرجعة للنترات، وذلك بنقله على وسط النترات (Puhalla, 1985) [9] و (Correll *et al.*, 1986) [10].

للتأكد من استقرار الطفرة زرع من كل ميسليوم مقاوم للكلورات، 5 قطع موزعة في طبق بتري به بيئة نترات.

في حالة ظهور نمو خفيف ومحدود لميسليوم شفاف بصورة زاحفة فقط مع قلة التفريع، فهو نسخ طافر مستقر غير مرجع للنترات (Clone mutant *nit*). أما النمو الطبيعي للميسليوم بتكوين هيفات ميسلية غزيرة ذات مظهر قطني، فهو نسخ طافر غير مستقر استعاد القدرة على استعمال النترات من جديد (*c*hlorate *r*ésistant *u*tilisant les *n*itrates) (*crun*).

و- تحديد نوع الطفرات الواقعة لدى النسخ غير المرجع للنترات

يزرع كل نسخ طافر غير مرجع للنترات على البيئات التشخيصية التي تحتوي كل واحدة مصدر ازوت مختلف، و هي : النترات، النتريت و الهيبوكسانتين. و يشخص نوع الطفرة على حسب مورفولوجية الهيفات الميسيلية الناتجة على البيئات المستعملة.(جدول2).

جدول (2) : البيئات التشخيصية المختلفة وفق (Klittich and Leslie, 1988) [11].

نوع الطفرة	النمو على البيئات المختلفة		
	النترات Nitrate	نتريت Nitrite	هبوكسانتين Hypoxanthine
crun	A	A	A
nit 1	r	A	A
nit 3	r	r	A
nit M	r	A	r

- **r** : ميسليوم شفاف المظهر، زاحفة فقط و قليل التفريع،
- **A** : ميسليوم غزيرة النمو، قطني المظهر،
- **nit 1**: طفرة في أنزيم المرجع للنترات (Nitrate reductase).
- **nit 3** : طفرة في أنزيم المرجع للنتريت (Nitrite reductase).
- **nit M** : تمثل طفرة في مركب إنزيمي مسؤولة على تنظيم المعامل المساعد للموليبدان.

ز- اختبار التكامل الخضري:

تعتبر الأفراد (nitM) مكملة قوية لـ(nit1) و (nit3) عند إجراء أي إختبار للتكامل الخضري. يتم تحديد المجامع المتكاملة خضريا بمواجهة (nitM) مع (nit1) او (nit3) في طبق بتري على وسط النترات؛ ثم المشاهدة، بعد 7 أيام من التحضين على 28°م، مورفولوجية الميسليوم عند منطقة المواجهة. فإذا حدث إندماج خلوي بينهما، يظهر في منطقة المواجهة ميسليوم قطني هوائي كثيفة (Joaquim and Rove, 1990, 1991، [12, 13]، كما في شكل (٢) ، و تكون الأفراد إذن متكاملة خضريا و تنتمي إلى نفس المجموعة (VCG) (Correll *et al.*, 1989) [14].

خلال تجربتنا تحققنا من أن الأفراد متكاملة ذاتيا أم لا، وذلك بمواجهة النسخ غير المرجعة للعزلة الواحدة لبعضها البعض، لأنه حسب (Correll *et al.*, 1989) [14] قد يحدث أحيانا في اختبارات التكامل الخضري أن بعض الأفراد، زيادة على عدم تكاملها مع الغير، تكون غير متكاملة ذاتيا.

III- النتائج

أظهرت نتائج تشخيص الطافرات الحساسة للكلورات (الشكل 1)، و حسب الجدول (3)، أن النسبة الكبيرة للطفرات المرجعية للنترات كانت من نوع (crun)، 66,4، 79,6، عند العزلات المرضة و الرمية لعشائر *Fo*، على التوالي. بينما النسبة المئوية للطفرات الحساسة للكلورات من نوع (nit3)، (nitM) أو (nit1)، كانت بنسب أقل تتراوح ما بين 5,4 و 15,5.

أما نتائج التكامل الخضري لكل العشائر المستعملة، حسب الجدول (4)، أظهرت أن هنالك مجموعة متكاملة خضريا (VCG1)، تضم كل العزلات الممرضة (1, 2, 4, 7, 12) والتي تنتمي إلى (*Foa*)، (الشكل 2).

أما العزلات المتبقية غير الممرضة (3, 5, 6, 8, 10, 11) و التي تنتمي إلى (*Fo*)، فلم تظهر أي نوع من التكامل الخضري، لا الذاتي ولامع أي من الأفراد الأخرى التي تنتمي إلى(VCG1).

IV- المناقشة

تم التأكد من العزلات الممرضة المدروسة حسب (Djerbi *et al.*, 1985) [15] (Sedra and Djerbi, 1985) [16].

أظهرت النتائج المحصل عليها من تجارب الزرع على بيئة الكلورات أنه تكون لدينا هيفات ميسلية غير مرجعة للنترات، وهذا كان مطابقا لنتائج (Bowden and Leslie, 1992) [17].

إن جمع كل العزلات من *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* المحصل عليها من أشجار النخيل المصابة بالذبول الفيوزاري (الجهة الغربية للجزائر) في مجموعة متكاملة خضريا (VCG1)، يدل على أن عشيرة هذا الشكل الخاص الموجودة بهذه المنطقة متجانسة من ناحية التكامل الخضري وهي مستقرة و لم تتنوع لهذه الصفة. لأنه حسب (Leslie, 1993) [18]. فإن التكامل الخضري يمكنه أن يحدث مع فطريات مختلفة و متجانسة في النوع ووضعية مماثلة عند نفس الشكل الخاص للفطر، تحصلوا عليها (Tantaoui and Boisson, 1991) [19] عند دراستهم لعزلات من جنوب المغرب.

بصفة عامة وحسب عدة دراسات يوجد تنوع لدى عشائر الأشكال الخاصة لـ(*Fo*). فعند الشكل الخاص *vasinfectum* و *dianthi* نتائج مماثلة تحصل عليها (Katan and Katan, 1988) [20] و (Katan *et al.*,1989) [21]. لكن عند الشكل الخاص *melonis*، فعدة عزلات لأربع سلالات وضعت ضمن خمس مجاميع متكاملة خضريا (Jacobson and Gordon, 1988) [22]، وكذلك عند الشكل الخاص *cubense* فحصرت سبع مجاميع متكاملة خضريا لكل العزلات المحصل عليها عالميا (Ploetz and Correll, 1988) [23].

تختلف الوضعية السابقة عند عشائر (*Fo*) المترممة المعزول من التربة، فغالبية العزلات غير متكاملة ذاتيا (Correll *et al.*,1986) [10]، فان عدد المجامع المتكاملة خضريا تكون بعدد العزلات المترممة (Katan and Katan, 1988) [20] و (Katan *et al.*, 1989) [21].

جدول (3): النسب المئوية لأنواع النسخ الطافرة للكلورات المحصل عليها.

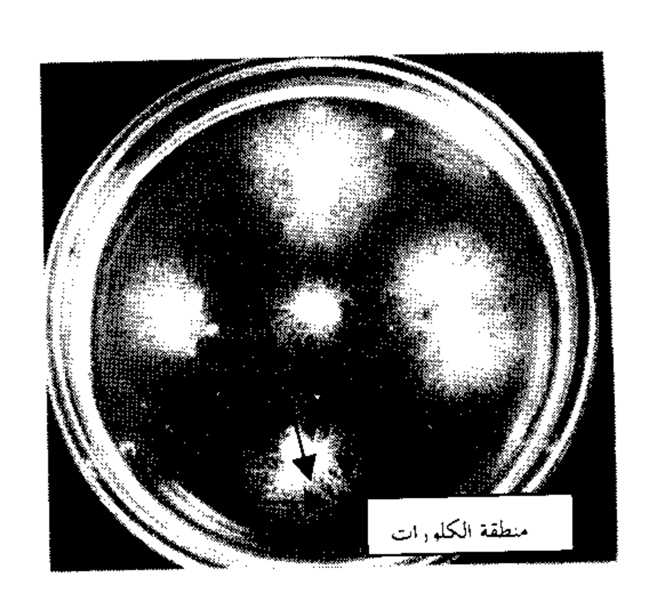
نوع عشيرة الفطر	التقديرات الحسابية	مجموع النسخ الحساسة للكلورات	Crun	NitM	Nit1	Nit3
المرضة Foa	متوسط عدد النسخ الطافرة للكلورات	116	77	18	13	8
	النسبة المئوية%	100	66,4	15,5	11,2	6,9
الرمية Fo	متوسط عدد النسخ الطافرة للكلورات	93	74	7	7	5
	النسبة المئوية%	100	79,6	7,5	7,5	5,4

جدول (4) : نتائج اختبارات التكامل الخضري.

المجموعة الخضرية	العزلة	*Foa* 1	*Foa* 2	*Foa* 4	*Foa* 7	*Foa* 12	*Fo* 3	*Fo* 5	*Fo* 6	*Fo* 8	*Fo* 10	*Fo* 11
VCG 1	*Foa* 1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Foa 2		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Foa 4			+	+	+	-	-	-	-	-	-
	Foa 7				+	+	-	-	-	-	-	-
	*Foa*12					+	-	-	-	-	-	-
	Fo 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fo 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fo 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fo 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fo 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

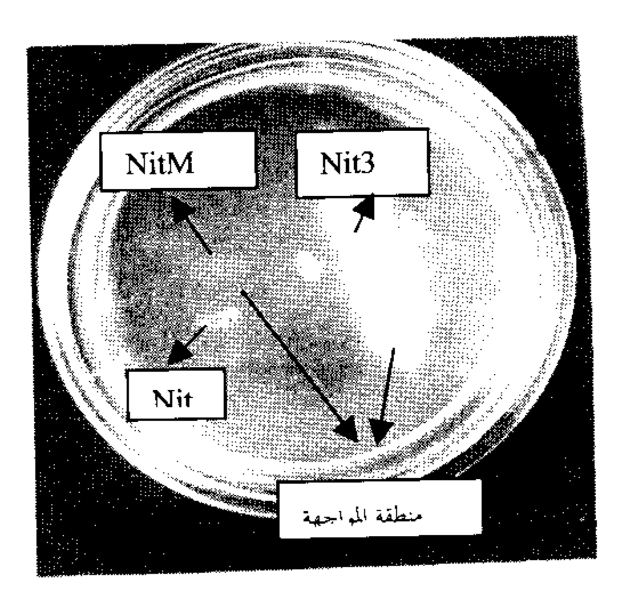
+ (تكامل خضري) : منطقة المواجهة أعطت ميسليوم غزيرة النمو، قطني المظهر،

- (ليس هناك تكامل خضري) : منطقة المواجهة أعطت ميسليوم شفاف المظهر،



2

الشكل 1 : (Chlorate Zone) منطقة الكلورات تبين هيفات ميسلية طافرة مقاومة للكلورات نامية على بيئة الكلورات.



1

الشكل 2 : نتيجة المواجهة بين النسخ الغير مرجع لأنزيم النترات على بيئة النترات.

References

1. Messiaen, C.M and Cassini, R. 1968. Recherches sur les fusarioses : IV- La systématique des *Fusarium*. Ann. Epiphytes, 19, 387-454.
2. Bounaga, N. 1985. Contribution à l'étude de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Killian et Maire), agent de la fusariose du palmier dattier. Thèse de doctorat d'état, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumédiène, Alger. 195 p.
3. Djerbi, M. 1990. Méthode de diagnostic du bayoud. In: Compte rendu de l'atelier sur le diagnostic et l'éradication du bayoud. Ghardaïa (Algérie) 3-7 Juin 1989.
4. Brac De La Perière, R. and Benkhalifa, A. 1991. Identification des cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) du sud-ouest Algérien. Plant Genetic Resources Newsletter, 78/79, 13-19.
5. Correll, J.C.; Klittich, C.J.R. and Leslie, J.F. 1987. Nitrate non utilising mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests . Phytopathology, 77: 1640-1646.
6. Puhalla, J. 1979. Classification isolats of *Verticillium dahliae* based on heterokaryon incompatibility. Phytopathology, 69: 1186-1189.
7. Correll, J.C., Gordon, T.R. and Mc Cain, A.H. 1988. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology, 78 : 1017-1021.
8. Henni, J.; Boisson, C. and Geiger, J.P. 1994.Variabilité intraclonale de la morphologie chez le *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Phytopath. Medit, 33 : 10-16
9. Puhalla, J.E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Can. J. Bot. 63,179-183.
10. Correll, J.C.; Puhalla, J.E. and Schneider, R.W. 1986. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* on the basis of colony size, virulence and vegetative compatibility. Phytopathology, 76 : 396-400.
11. Klittich, C.J.R and Leslie, J.F. 1988. Nitrate reductase of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). Genetics, 118 : 417-423.
12. Joaquim, T.R. and Rove, R.C. 1990. Reassessment of vegetative compatibility relationships among strains of *verticillium dahliae* using nitrate nonutilising mutants. Phytopathology, 8٠: 1160-1166.

13.Joaquim, T.R. and Rove, R.C. 1991. Vegetative compatibility and virulence of strains of *verticillium dahliae* from soil and potato plants. Phytopathology, 81: 552-558.

14.Correll, J.C.; Klittich, C.J.R. and Leslie, J.F. 1989. Heterokaryon self-incompatibility in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). Mycol. Res., 93: 21-27.

15.Djerbi, M., Sedra, M.H. and El Idrissi Ammari, M.A. 1985. Caractérisation culturale et identification du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis,* agent causal du Bayoud. Ann. Instit. Nat. Rech. Agr. Tunisie, 58, 1: 1-8.

16.Sedra, M.H. and Djerbi, M. 1985. Mise au point d'une méthode rapide et précise d'identification du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* agent causal du Bayoud. Ann. Instit.. Nat. Rech. Agr. Tunisie, 58, 2: 1-12.

17.Bowden, R.L. and Leslie, J.F. 1992. Nitrate non utilising mutants of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) and their use in determining vegetative compatibility. Exp. Mycol., 16: 308-315.

18.Leslie, J.F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Ann. Rev. Phytopathol., 31: 127-151.

19.Tantaoui, A. and Boisson, C. 1991. Compatibilité végétative d'isolats du palmier dattier *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* de la rhizosphère du palmier dattier. Phytopath. Medit, 30 : 115-163.

20.Katan, T. and Katan, J. 1988. Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* from tissue and rhizosoft cotton plants. Phytopathology, 78 : 852-855

21.Katan, T.; Hadar, E. and Katan, J. 1989. Vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation in Israel. Plant. Path., 38 : 376-381.

22.Jacobson, D.J. and. Gordon, T.R; 1988. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis.* Phytopathology , 78 : 668-672

23.Ploetz, R.C. and Correll, J.C. 1988. Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Plant Dis. 72: 325-328.